云南植物研究 2007, 29 (4): 447～456
Acta Botanica Yunnanica

高等植物的交替氧化酶研究进展*

王雅英[1,2]，田惠桥[2]**

(1 福建漳州市农业科学研究所，福建 漳州 363005; 2 厦门大学生命科学学院，福建 厦门 361005)

摘要: 交替氧化酶 (Alternative Oxidase，AOX) 广泛存在于高等植物、藻类和原生生物线粒体内膜。从主呼吸链的辅酶 Q 分岔，是氧化辅酶 Q、还原氧分子生成水的另一终端氧化酶。氧化过程没有质子穿膜运动、热量以产热方式散发。产热植物中交替氧化产生的热量使花粉发出芳香味吸引虫传粉。推测植物 AOX 使植物在环境胁迫下维持呼吸，调节能量平衡，抵抗氧化胁迫，保持三羧酸循环的运行。AOX 是首次发现的双铁羧酸蛋白质成员中的膜蛋白质，AOX 与膜分离后容易失活，至今尚未有三级结构的报导，只有二级结构的 2 种假设模式，最新的模式 AOX 为膜界面蛋白质而不是跨膜蛋白。最近我们的研究表明有 2 个途径可获得适量有活性的 AOX：建立优化的 pFLAG-1-AOX 大肠杆菌超量表达系统；从产热植物如斑叶阿若母 (*Arum maculatum*) 花序组织线粒体分离纯化有活性的 AOX。

关键词: 交替氧化酶；高等植物；研究进展

中图分类号: Q 945　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0253-2700 (2007) 04-447-10

The Study Progress of Alterative Oxidase in Higher Plant

WANG Ya-Ying[1,2]，TIAN Hui-Qiao[2]**

(1 *Agricultural Sciences Institute*, Zhangzhou 363000, China; 2 *School of Life Sciences*, *Xiamen University*, Xiamen 361005, China)

Abstract: Alternative oxidase (AOX), a terminal oxidase located in the inner mitochondrial membrane, has been identified universally in plant, algae, fungi, and protozoan. AOX branches from the cytochrome pathway at the level of the ubiquinone and catalyses the oxidation of ubiquinol and reduction of oxygen to water. There is non-protonmotive and energy is liberated as heat instead of producing ATP. In thermogenic plants, heat released by AOX attracts insects for pollination by heating aromatic compounds. The use of AOX in plant may (a) allow flexibility of respiration under changing environmental conditions (b) regulate energy homeostasis (c) help prevent oxidative stress (d) maintain TCA cycle turnover. AOX is a member of di-iron carboxylate proteins. Two structural models exist for AOX and the latest one is a monotopic protein instead of span membrane. Relatively little is known about its 3-dimensional structure. Main reason is that the sufficient quantities of AOX suitable for crystallogram structural studies is unavailable because of its unstableness. Recently we tried to obtain sufficient quantities alternative oxidase protein (AOX) for further construction studies. The aim is achieved by over-expressing in *E. coli* and improving purification of native AOX from Arum mitochondrial.

Key words: Alternative Oxidase; Higher Plant; Studying Progress

植物除主呼吸链外，还存在其它电子传递分支途径，如对氰化物、抗霉素 A 不敏感的抗氰呼吸或交替呼吸途径 (Alternative path，AP) (图 1.1)。交替氧化酶 (alterative oxidase，AOX) 是交替呼吸途径中的末端氧化酶，普遍存在于高等植物、真菌、藻类和部分寄生虫以及原核生物中 (Berthold 等，2002)。该途径只有电子传递但不伴随质子穿膜运动，不能形成驱动 ATP 合成的

---

* 基金项目：国家自然科学基金 (No. 30570104)

** 通讯作者：Author for correspondence. E-mail: hqtian@jingxian.xmu.edu.cn; Tel: 0592-2186486

收稿日期：2006-07-13，2007-01-25 接受发表

作者简介：王雅英 (1962-) 女，副研究员，理学博士，植物学

膜质子势差，因而没有 ATP 合成，是一种耗能呼吸（Moore 等，1978）。在佛焰花序植物中，花序产热释放出芳香气味吸引昆虫帮助传粉。推测 AOX 还与果实成熟（梁五生和梁厚果，1997）、抗逆抗氧化胁迫（吴强等，2003），抗水分胁迫（何军贤等，1999），抗真菌和抗病毒病理有关（Berthold 等，2002）。目前，有关植物抗氰呼吸的环境调节以及环境胁迫条件下植物抗氰呼吸的生理学意义已成为植物呼吸代谢领域的前沿课题（吴强等，2003）。但由于 AOX 与线粒体膜分离后其活性不稳定，很难获得适量纯的具活性的 AOX 供其三级结构分析，有关它的结构及代谢调控机理还不清楚（Hourton-Cabassa 等，2004），本文结合作者分离纯化活性 AOX 的研究，介绍近年来 AOX 研究进展。

1 高等植物中的交替氧化酶

植物中的抗氰呼吸是呼吸链的分枝途径，它从辅酶 Q 分枝。有些专一性的电子传递抑制剂可以阻断呼吸链中某一部位的电子传递。如鱼藤酮（rotenone）、安米妥（amytal）可阻断电子由 NADH 向辅酶 Q 传递，抗霉素 A（antimycin A）抑制电子从细胞色素 bc1 向细胞色素氧化酶传递；氰化物阻止电子从细胞色素氧化酶传至氧；水杨酸羟肟酸（SHAM）则阻止辅酶 Q 的电子向交替氧化酶传递（潘瑞炽等，2004）。在细胞色 c 还原酶和细胞色素氧化酶抑制剂（例如抗霉素 A 和氰化物）存在时，电子传递依然能沿着交替途径进行。而羟氨基酸和五倍子酸化合物能抑制 AOX 活性，却不影响主呼吸链途径活性（Hoefnagel 等，1995a）。产热植物枯苞（*Sauromatum guttatum*）、海芋（*Arum maculatum*）的线粒体产生较高热量就是由于其富含 AOX。有些佛焰花序植物在冬天开花时，花序温度可在一定时间内提高 10℃以上就是因为花序中大量的线粒体进行抗氰呼吸的缘故。

尽管很早就有人发现对氰化物不敏感的 AOX 呼吸途径，但相对于其它呼吸蛋白，因为缺少纯化的活性 AOX，至今 AOX 的三级结构及酶活性调节机理还不清楚。上世纪 80 年代从产热植物线粒体中分离到不完全纯化的 AOX，表明抗氰呼吸活性是辅酶 Q 氧化和氧分子还原成水的过程，由单一呼吸氧化酶（AOX）负责催化。从枯苞获得 AOX 单克隆和多克隆抗体，AOX 研究迈出重要一步。AOX 的分子量为 35～37 kDa（Elthon 等，1989）。线粒体中表现出抗氰呼吸活性 AOX 分子量为 36 kDa（梁五生和梁厚果，1997）。有人发现枯苞的功能性 AOX 约为 30 kDa，

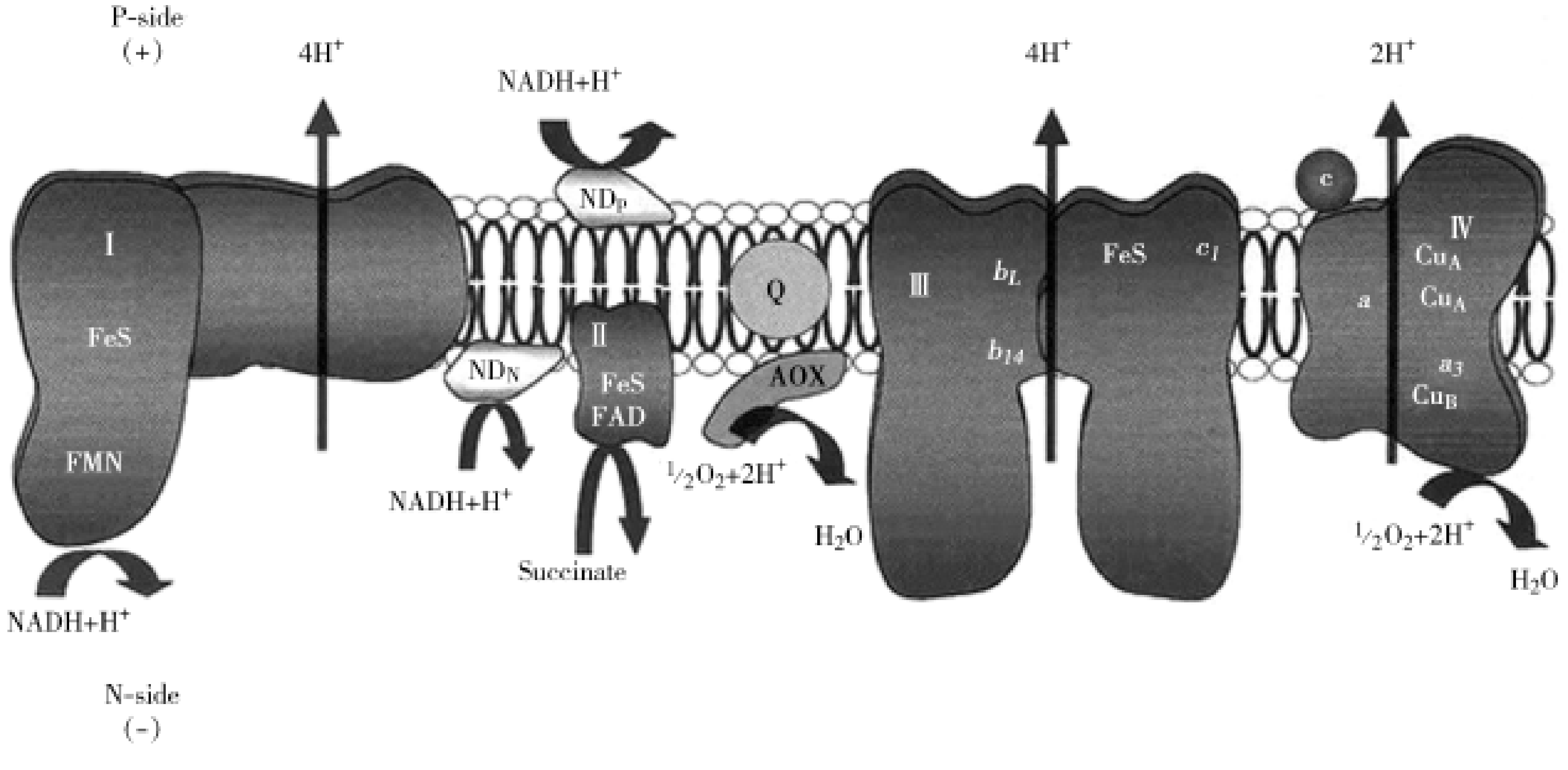


图 1 植物线粒体呼吸链（Whitewood and Moore，2004）。

P-side：线粒体内膜外侧，N-side：线粒体内膜内侧。NDp：位于线粒体内膜外侧的 NADH，

NDn：位于线粒体内膜内侧的 NADH。AOX：交替氧化酶，Succinate：琥珀酸。

Fig. 1 The respiration chain of plant

免疫反应实验表明 AOX 通过还原巯基形成二聚体的方式失活（Umbach and Siedow，1993）。

首次从大肠杆菌 cDNA 文库中分离到该酶的基因，AOX 基因是核编码，在细胞质中翻译，进入线粒体之前的全蛋白全分子量约为 39 kDa（Rhoads and McIntosh，1991）。Kumar and Sou（1996）的研究表明细胞表达的 AOX 需经过修饰后才具活性，活性分子量为 31 kDa。

主呼吸链和交替途径的电子传递之间的分歧机制研究得较多。当细胞色素途径饱和时，AOX 途径才传递电子（Bahr and Bonner，1973）。但这种只考虑了抑制剂对呼吸速率的影响而忽略了另一种可能性，即一个途径的抑制会改变底物的有效性，从而影响非抑制的电子传递途径（Millar 等，1995）。Moore 等（1988）用 Q—电子仪同时测定呼吸活性和离体线粒体 Q 池的还原水平，发现细胞色素与 Q 氧化还原势是线形相关，与 AOX 呈非线形相关：当 Q 氧化还原势降低 20% 时，AOX 活性不成比例的提高。有机酸提取研究有关 Q 氧化还原势的结果也得出相同结论（Ribas-Carbo 等，1995）。Hoefnagel 等（1995b）用电化学方法的测得结果也表明，AOX 被低 Q 氧化还原势激活后，可以与细胞色素途径争夺底物 QH_2。

分光光度计测定了离体线粒体 AOX 和细胞色素对氧化型辅酶 I（NADH）的氧化亲和性。AOX 对氧的亲和力（1.7 μM）是细胞色素的 10 倍（Millar 等，1994）。氧分子电压仪的方法重复研究 AOX 的结果表明氧亲和力为 10～20 μM（Ribas-Carbo 等，1994），明显高于分光光度方法。但 2 个实验都表明 AOX 对 O_2 的亲和力明显高于细胞色素的趋势。低 Q 还原势下 AOX 氧亲和力明显提高。Affourtit 等（2001）则认为这是由于人为地失去 AOX 活体状态的调控作用，不是酶的内在性质。

2　交替氧化酶的结构

由于很难获得纯化的 AOX，所以用物理技术分析其蛋白质结构受到了限制，尽管人们曾做了许多尝试，但对其结构仍不明确（Zhang 等，1996）。根据 DNA 重组技术和序列知识，已经有多种关于 AOX 结构的假设，如 SUM 和 AN 模式（图 2）。SUM 模型（Siedow 等，1992）认为，2 个跨膜螺旋镶嵌在线粒体内膜，1 个“表面螺旋”位于膜间隙，N 末端和 C 末端为亲水结构域，伸进线粒体基质。C 端有 4 个小的螺旋，其中第 1 个和第 4 个螺旋各包含 1 个保守的 EXXH 模块，形成双核铁中心。N 端保守的半光氨酸残基可能是 AOX 单体间二硫键的形成位置。AOX 的 C 端有 3 个高度保守的区域，其中的两个区域，Glu Glu Glu-Ala-Ile-His 和 Ala Asp Glu-Ala-His-His，与甲烷单加氧酶（MMO）双核铁中心区域很相似（Rosenzweig 等，1993）。

Andersson and Nordlund（1999）认为 SUM 模

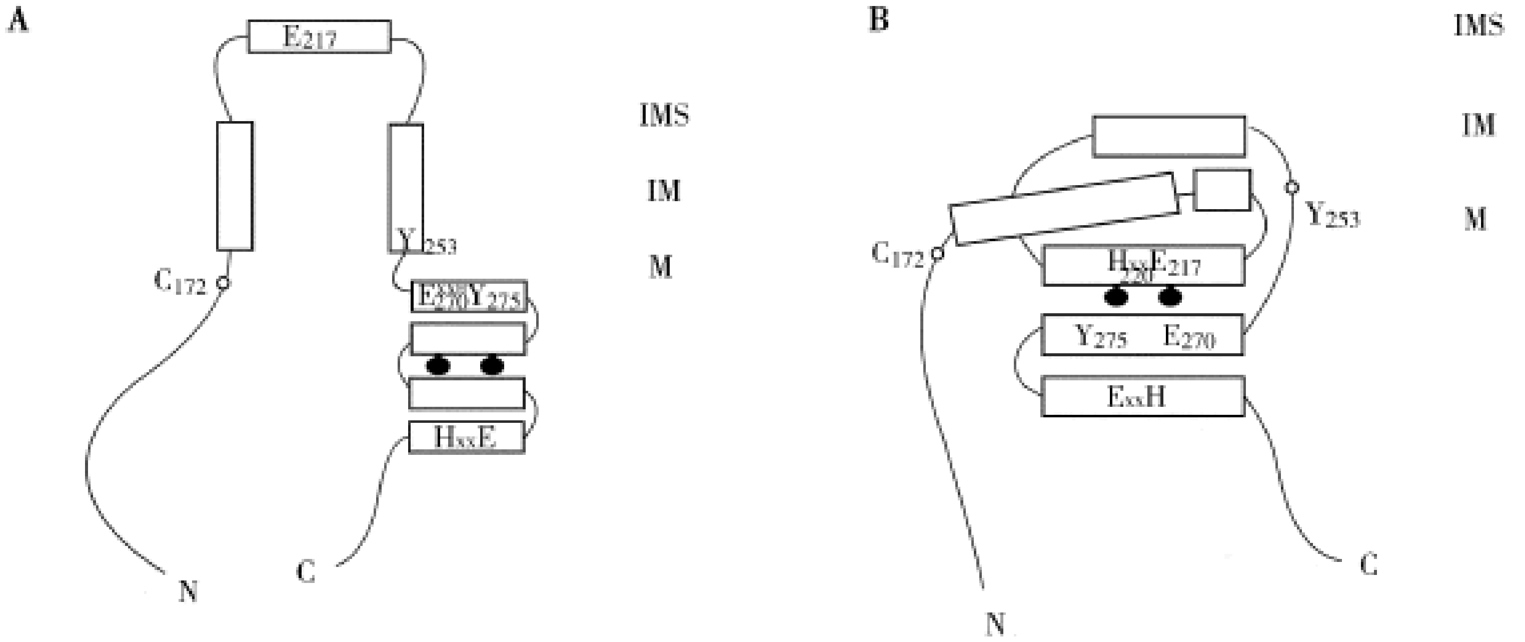


图 2　AOX 结构模式（Albury 等，2002）

A：SUM 模式；B：AN 模式（IMS：线粒体膜间隙；IM：线粒体内膜；M：线粒体基质；EXXH：铁结合模块）

Fig. 2　The AOX Structural Models

式和其它结构明确的双铁羧酸盐蛋白不一致。首先AOX的SUM模型中四螺旋纺缍形态折叠过程与其它双铁羧酸盐蛋白不相同；其次，所有两个铁蛋白中都有一个连接氨基酸残基（H273）却不存在于SUM模式中；第三，螺旋连接空间、顺序、方向均不同于该蛋白家族的其它蛋白。螺旋体比较短，因此蛋白质不如长螺旋体蛋白稳定（Aberg等，1993）。为了解释这些矛盾，Andersson and Nordlund（1999）提出类似其它双铁蛋白结构的AOX活性位点模式（AN模式）。这种新模型放弃了跨膜螺旋的假设，保留了双铁中心，以特别长的4螺旋束代替以前的短螺旋束，并认为这可能是交替氧化酶的活性位点，EXXH模块位于第2和第4螺旋上。新模式认为AOX是一种膜界面整合蛋白，是双铁核羧基蛋白家族中的一员，该家族包括核苷酸还原酶（RNR）R2亚基，甲烷单加氧酶（MMO），硬脂酰-ACP△9去饱和酶（吴强等，2003）。AOX模型不再是跨膜连接，而是通过疏水螺旋区平行膜表面与脂双层的单面相互反应，类似于其它结构已明确的内表面膜蛋白（Wendt等，1999）。

AOX氨基酸序列存在3个相邻谷氨酸残基（E268～E270），其中一个是SUM中的E270，另一个是AN中的E269。原位基因突变研究了E270的作用，发现突变基因E270N在酵母线粒体内膜的AOX失活，说明E270对催化起作用（Albury等，1998）。进一步的研究表明E270的丙氨酸、亮氨酸及天冬酰胺酸突变体都导致在大肠杆菌中表达的蛋白失活（Chaudhuri等，1998）。E270发生天冬酰胺或组氨酸突变后能保持20%活性，因为天冬酰胺和组氨酸能与铁结合，突变体能部分保留E270与铁结合的功能。E269发生丙氨酸突变也导致蛋白失活（Wu等，1998）。随后在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中发现编码与AOX相同蛋白质的基因突变体（Berthold等，2000），该蛋白是质体终端氧化酶（PTOX）。但PTOX只有一个谷氨酸，这二种酶连接铁原子的都是E268残基，而不是E270或E269（Ajayi等，2002）。但为什么E268～E270基因突变产生相同结果的机制尚不清楚。另二个位点E217A和H220A的突变也可使蛋白失活，但其原因更倾向于AN模式（Albury等，2002）。在SUM模式中E217与催化中心较远，当E217位点由Glu突变为Ala时，理论上对活性位点的影响较小，E217A的突变导致蛋白失活的可能性较小。在AN模式中，由于E217和H220就是铁结合位点，这两个位点的突变导致蛋白失活的解释更合理一些。研究AOX1a蛋白在大肠杆菌中的表达并首次获得AOX的电子顺磁共振（EPR）信号，证明是双铁羧酸盐氢氧桥键的特征（Berthold等，2002）。AOX蛋白分子中的E217或E268发生丙氨酸突变后，在蛋白失活的同时EPR信号消失，该实验支持AOX的AN模式。

3 交替氧化酶的催化机制

在呼吸作用的主要电子传递过程中，三羧酸循环中的氢传递体（辅酶Ⅰ，NADH和黄素腺嘌呤二核苷酸，$FADH_2$）将电子传递给泛醌（Q）形成还原型泛醌（QH_2），2个QH_2分子的4个电子经过细胞色素bc_1复合物，再传递给细胞色素氧化酶（含有两个铜离子），还原2个氧分子生成2个水分子。在交替呼吸过程中，2个QH_2分子的4个电子经过AOX传递给氧也形成2个水分子。由于AOX含有非血红素铁中心，而不是细胞色素氧化酶的铜中心，AOX的催化反应原理与细胞色素氧化酶的催化机制不同（Affourtit等，2000）。AOX可能以类似甲烷单加氧酶（MMO）的铁蛋白催化氧还原成水。通常MMO的2个三价铁离子（Fe^{3+}）可被QH_2还原为2个二价铁离子（Fe^{2+}），结合氧分子后形成氧和QH_2的中间产物，进而中间产物分开生成一个水分子和2个被氧化的三价铁离子。在没有甲烷底物时，MMO通过还原性高价铁离子（Fe^{4+}）发生氧化反应，QH_2将高价铁（Fe^{4+}）还原为三价（Fe^{3+}）而催化氧还原生成2个水分子（Affourtit等，2002）。有人则认为水的形成过程中高价铁离子和氧不形成中间产物，而是由高价铁离子将氧分子直接还原成水分子（Berthold等，2000）。

Affourtit等（2000）认为在细胞色素氧化酶活化过程中，由铜中心的4个电子还原氧分子是一步完成的。但在交替呼吸途径中，铁中心的二价铁离子有可能通过三价或一步产生四价铁离子并与氧结合使之还原成水。细胞色素氧化酶和光

合系统 II 都可由酪氨酰激活。AOX 也能被氨基酸激化，由 1 个或 2 个具还原活性的氨基酸提供电子替代高价铁，催化反应中双铁蛋白 RNR 还原活性的酪氨酸还原高价铁为三价铁（Berthold 等，2000；Albury 等，2002；Affourtit 等，2002）。当 AOX 中的 2 个酪氨酰发生变异时，常常会改变蛋白质的活性，比如其中一个突变体（Y275F）在酵母线粒体表达时蛋白失去酶活性，因此认为 Y275 可能是酶活化形式（Albury 等，2002）。

4　交替氧化酶的调控

AOX 有二种激活调节机制，一种是二聚体双硫键还原激活，另一种是有机酸直接激活 AOX 活性。上世纪 90 年代，Umbach and Siedow（1993）用电泳分离线粒体 AOX，发现其分子量为 30～40 kDa，而二聚体为 60～70 kDa。二氯二苯三氯乙酸（DDT）氧化还原使二者互换，说明连接两个单体的是双硫键桥。AOX 能被还原态的 DDT 还原激活（Umbach 等，1994）。还原态的 AOX 能通过化学方法再聚合，说明线粒体 AOX 存在非共价联接。线粒体中的 AOX 二聚体在自然条件下存在着共价和非共价结合两种状态，推测可能是硫氧化还原蛋白催化蛋白二硫键还原，从而使酶活化（梁峥等，2001）。线粒体内 NADH 还原 AOX 为结合蛋白，AOX 的活性由线粒体基质还原能力调节（Siedow and Umbach，1995）。

丙酮酸是三羧酸循环的底物，而 AOX 是电子传递链中的一个分支酶。Millar 等（1993）发现，加入丙酮酸后的线粒体 AOX 呼吸活性提高 4 倍，QH_2 氧化活性也提高。其它有机酸，如乙醛酸、草酰乙酸也能活化 AOX，但需要的浓度较高。有机酸活化 AOX 发生在线粒体基质，琥珀酸和苹果酸激活线粒体 AOX 活性是通过琥珀酸脱氢酶和苹果酸酶的作用，在基质中生成丙酮酸（Millar 等，1996）。丙酮酸改变 AOX 活力，同时内源 Q 氧化还原势也发生变化（Djajanegara 等，1999）。不加丙酮酸，Q 氧化还原势较高（40%～60%）时 AOX 活性才发生变化。加入丙酮酸，较低 Q 还原势（0%～20%）就可使 AOX 活性发生改变。丙酮酸能提高 AOX 与 QH_2 的亲和力（Umbach 等，1994）。有人则认为丙酮酸只是激活 AOX 并明显改变最快的反应速度（Vmax）但不影响酶与 QH_2 的亲和力（Hoefnagel 等，1997）。丙酮酸能活化硫醇进一步还原 AOX，但不能激活共价连接的 AOX（Vanlerberghe 等，1995）。研究半胱氨酸与氢硫基化合物相互作用影响大豆线粒体 AOX 活性，发现用 NEM（乙基马来酰亚胺）预处理能干扰丙酮酸的激活作用，从而抑制 AOX 活性（Umbach and Siedow，1996）。

氨基酸序列分析表明，AOX 的两个半胱氨酸残基 C122、C172 是 AOX 二聚化的位置。原位基因突变 AOX1（Vanlerberghe 等，1998）和 AOX1a（Rhoads 等，1998）研究，C122 突变可使 AOX 不为丙酮酸激活，也不为化学氧化聚合。野生型 AOX 的 95% 活性依赖 α-酮酸，而 C122E（突变为谷氨酸）突变的蛋白酶不为丙酮酸激活。此种基因突变还表明，这个位点上的电荷变化是重要的因子，可诱导正电荷或负电荷，其蛋白质的性质与 C122E 突变体相似，也不为丙酮酸激活。大豆 C122A（突变为丙氨酸）突变体也不为丙酮酸激活，但却能为大肠杆菌膜和烟草线粒体的琥珀酸激活（Djajanegara 等，1999）。C122S 突变体也有这个特性（Umbach 等，2002）。这种生理现象与含丝氨酸的同工酶有关（Holtzapffel 等，2003）。有实验表明含 C122 同工酶的 AOX1b 及 AOX1a 在酵母表达，其离体线粒体 AOX 活性能为琥珀酸和丙酮酸分别激活（Holtzapffel 等，2003）。与丙酮酸相比，AOX 与琥珀酸和丝氨酸及丙氨酸之间都不能产生共价联接，说明可能还有其它的作用机制。

AOX 活性调控受多种因素影响，环境胁迫，植物受伤、冻害、干旱、渗透压及病菌等都可诱导 AOX 表达。水杨酸（SA）、过氧化氢、乙烯和主呼吸链抑制剂也同样能诱导 AOX 在植物中的表达。抗氰呼吸活性和 AOX 表达在产热植物的佛焰花序中较高（Leach 等，1996）。在非产热植物中，AOX 表达水平与发育状态有关，如在衰老（Maxwell 等，2002）和果实成熟过程中都有 AOX 的表达（Holtzapffel 等，2002）。

大豆（Finnegan 等，1997）、水稻、芒果、玉米（Karpova 等，2002）的 AOX 是多基因家族，大豆和水稻不同组织 AOX 表达水平不同（Saika 等，2002）。AOX 蛋白有亚分子 AOX1 和 AOX2

(Considine 等，2002)。在单子叶和双子叶植物中 AOX1 蛋白是瞬间表达的，但在双子叶植物中 AOX2 则有调控代谢的功能。玉米主呼吸链中的复合体 I 和 IV 的缺损突变时，AOX 表达，这暗示复合体 I 和 IV 对 AOX 可能有调节作用 (Karpova 等，2002)。复合物 I 的异常可能诱导 ZmAOX2 (含 *C*122 基因) 表达，复合物 IV 的异常可能诱导 ZmAOX3 (含 *S*122 基因) 表达。野生种主呼吸链受鱼藤酮和氰化物抑制后，AOX 表达水平提高。拟南芥植物 AOX 5 个基因 (Aox1a，1b，1c，1d and 2) 都表达，有多个途径诱导 AOX 表达，而每个途径的诱导表达水平存在差异 (Clifton 等，2006)。

5　交替氧化酶的生理功能

AOX 调节能量代谢，当能量代谢饱和时，AOX 途径以散热方式释放能量，维持电子传递和 TCA。Lambers (1982) 提出的能量溢满理论认为：当主呼吸链活性受到抑制时，或细胞还原力偏高时，电子通过 AOX 传递可使 TCA 循环和糖酵解继续进行。AOX 活性能为 TCA 循环底物丙酮酸激活 (Millar 等，1993)，说明 TCA 循环的底物过高时可诱导 AOX 途径转移部分电子。环境变化导致 AOX 表达差异，不仅改变线粒体功能，也影响线粒体外细胞功能 (Clifton 等，2006)。

氧胁迫诱导 AOX 表达并抗氧化，当细胞色素途径受抑时，主呼吸链产生活性氧 (ROS)，AOX 氧化可使 ROS 下降 (Purvis and Shewfelt，1993)。在转基因烟草中 AOX 的超量表达时 ROS 水平下降，反之 ROS 水平则提高 (Maxwell 等，1999)。AOX 活性水平可能与细胞程序性死亡有关，AOX 活性低的转基因烟草细胞对致死化合物过氧化氢很敏感 (Vanlerberghe 等，2002)，而高活性 AOX 大豆细胞则表现出抗死亡诱导 (Amor 等，2000)。AOX 能降低 ROS，从而降低细胞死亡 (Vanlerberghe 等，2002)。AOX 对植物抗逆性的作用可以应用在选育高产作物品种，AOX 基因作为作物高产新品种的标志 (Arnholdt-Schmitt 等，2006)。

低温胁迫明显诱导交替氧化酶 AOX 总量增加 (晏婴才等，2004)。而高温对抗氰呼吸有明显的抑制作用，吴强等 (2003) 认为可能是：(1) 高温部分地抑制了交替氧化酶的合成，(2) 交替氧化酶本身对热比较敏感，(3) 热胁迫过程中大量产生的活性氧改变了交替氧化酶的结构。活性氧含量的变化可能是导致热胁迫过程中抗氰呼吸变化的主要原因之一 (周功克等，2000)。水分胁迫通过抑制 AOX 基因的表达而降低抗氰呼吸运行活性 (何军贤等，1999)。Hansen 等 (2002) 测量热呼吸发现环境变化能改变植物生长率，AOX 对植物生长动态起平衡作用。产热植物通过 AOX 释放的热量可使花粉散发芳香气味吸引虫媒 (Meeuse 等，1975)。非产热植物组织中 AOX 的表达与此同产热无关 (Borecky and Vercesi，2005)。

AOX 可有效调控呼吸率保持细胞能量恒定以保证植物在环境变化时正常生长 (Hansen 等，2002)。AOX 不仅使拟南芥在低温下发芽，而且 AOX 能防止植物组织在逆境中产生过氧化物而广泛影响细胞功能 (Fiorani 等，2005)。AOX 在细胞质和一些碳代谢途径中发挥重要作用 (Umbach 等，2005)。各种环境胁迫都能改变植物抗氰途径的运行，但这些研究还很肤浅，其运行的信号调节机制和生理意义还不清楚 (吴强等，2003)。

6　AOX 基因异源表达

大肠杆菌或酵母系统表达外源 AOX 基因，生产 AOX 蛋白质的研究才刚刚起步，国内几乎还是空白。影响蛋白质表达的关键因子为：宿主菌性质、细胞培养温度、诱导物异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG) 浓度和起始诱导细胞密度 (OD_{600}) (FLAG *E. coli* Expression System Manua，SIGMA 1998)。近几年，大肠杆菌表达 AOX 重组蛋白表达大多数采用 Berthold 的 (2002) 方法，即细胞密度 OD_{600} = 0.5，诱导后细胞培养温度 18℃，IPTG 浓度 0.1mmol/L。表达研究主要集中在 AOX 保守氨基酸残基突变基因和野生基因在大肠杆菌中表达，测定 AOX 活性及分子量，目的是研究 AOX 分子中氨基酸残基对酶活性的作用，进而推测 AOX 分子结构。例如，拟南芥 (*Arabidopsis*) AOX1a，在大肠杆菌 C43 中功能性表达，获得与细胞膜结合的具有活性的 AOX，AOX 分子量为 29 kDa 和 33 kDa，半胱氨酸残基 Cys-78 和 Cys-128 是 AOX 活性调控位置

(Finnegan 等，1997)。大肠杆菌 DE3 优化表达锥体虫（*T. b. brucei*）线粒体 AOX（TAO），优化表达 TAO 的条件为：30℃，OD_{600} = 0.1，IPTG 0.1 mmol/L，80%的 TAO 与细胞膜结合为有活性的膜蛋白，膜 TAO 分子量 34 kDa（Fukai 等，2003）。OD_{600} = 0.5，18℃，IPTG 0.1 mmol/L 诱导，AOX 大肠杆菌高表达，首次提出双核铁中心实验证据（Berthold 等，2002）。酵母表达 AOX 并进行铁融合位点氨基酸残基原位突变研究，AOX 功能表达使酵母生长速率和产量降低，首次报导 AOX 表达的表型影响（Affourtit 等，1999）。Berthold（2003）在大肠杆菌 DE3 成功表达了拟南芥 AOX，使用单一质粒载体（univector），表达 N 端重组蛋白，不同大肠杆菌宿主 BL21（DE3），C41（DE3），和 C43（DE3）表达 MBP AOX 融合蛋白，各宿主之间表达水平相似。但载体质粒性质和启动子强度影响 AOX 表达，重组载体 pHOST-AOX 表达 AOX 包涵体，而载体 pHB-MALc2X 则表达高水平的膜 AOX。Tac 启动子能高效表达 AOX，例如，tac MBP 或 tac NusA 能表达 AOX 结合蛋白，启动子 T7 则不能。选择合适的启动子和调整翻译速度可以提高 N-端 AOX 融合蛋白表达。已有的表达研究只获得与不溶的 AOX（或 TAO）。尚未建立有效的 AOX 大肠杆菌大量表达系统（Berthold 等，2002；2003；Albury 等，2002）。最近作者建立了大肠杆菌 pFLAG-1-AOX 分泌表达系统，优化条件下表达 AOX，即细胞生长温度 37℃，细胞密度 OD_{600} = 0.6，IPTG 浓度 0.2 mmol/L，1 h 收获细胞，获得少量可溶 AOX 融合蛋白转运到周质空间和大量不溶的 AOX。

7 从植物组织和细胞分离天然 AOX

已经从不同植物和不同组织分离线粒体，烟草细胞（晏婴才等，2002，2004）、菜豆胚轴与真叶（代其林等，2004）、苹果果肉（雷晓勇等，2002）、酵母细胞（Affourtit 等，2000）、转基因番茄（Umbach 等，2002）、大豆（Amora 等，2000）、斑叶阿若母（*A. maculatum*）花序组织（Affourtit 等，2004）、枯苞（*S. guttatum*）花序组织（Elthon 等，1989）、碗豆叶片和芜箐甘蓝（Moore 等，1988）、绿豆（Cottingham 等，1983）、矮牵牛花细胞（Wagner 等，1995）、陈化马铃薯切片（梁五生等，1999）。早期的工作是分离线粒体，用主呼吸链抑制剂结合氧电极测定离体线粒体交替氧化活性（Moore 等，1988），线粒体具有交替氧化酶活性。SDS-PAGE 分离线粒体总蛋白，用枯苞花序 AOX 单克隆抗体进行免疫分析，检测交替氧化酶分子量，大多数天然 AOX 存在二个以上不同分子量，烟草细胞 AOX 为 35 kDa 和 70 kDa（晏婴才等，2002），菜豆为 35 kDa 和 38 kDa（代其林等，2004），苹果果肉为 35～37 kDa 和 90 kDa（雷晓勇等，2002）和斑叶阿若母（*A. maculatum*）花序组织为 30～32 kDa（Affourtit 等，2004）。进一步分离线粒体各组份，发现线粒体总 AOX、线粒体膜 AOX 和可溶性 AOX 具有交替氧化活性。用蛋白质去污剂 deoxyBigCHAP 将 AOX 从斑叶阿若母花序组织线粒体膜上溶解下来，并纯化溶解下来的线粒体膜 AOX 溶液，获得具有高活性的 AOX，但是纯化后有活性的 AOX 依然存在不同分子量形式（Affourtit 等，2004），不能用于 AOX 结构分析。最近我们也从植物分离了活性稳定的 AOX，双向电泳获得充分分离的 AOX 蛋白质斑点，等电点为 pH6.4 和 pH7.4 之间出现 4 个 AOX 蛋白质点，这 4 个分子量相近而等电点不同的 AOX，可能 AOX 多基因家族不同基因产物，也可能是同一基因产物的异构体，有待对双向电泳凝胶版 AOX 蛋白质点进行氨基酸序列分析结果加以确定。

〔参考文献〕

梁峥，梁厚果，2001．植物呼吸代谢［A］．见：余叔文，汤章城，植物生理与分子生物学［M］．北京：科学出版社，344—365

潘瑞炽，王小青，李娘辉，2004．植物生理学 第四版［M］．北京：高等教育出版社，110

Aberg A，Nordlund P，Eklund H，1993．Unusual clustering of carboxyl side-chains in the core of ironfree ribonucleotide reductase［J］．*Nature*，**361**：276—278

Affourtit C，Albury MS，Whitehouse DG *et al*．2000．The active site of the plant alternative oxida：structural and mechanistic considerations［J］．*Pest Manag Sci*，**56**：31—38

Affourtit C，Krab K，Moore AL，2001．Control of plant mitochondrial respiration［J］．*Biochim Biophys Acta*，**1504**：59—70

Affourtit C，Albury MS，Crichton PG *et al*．2002．Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis［J］．*FEBS*

Lett, **510**: 122—126

Affourtit C, Moore AL, 2004 . Purification of the plant alternative oxidase from *Arum maculatum*: measurement, stability and metal requirement [J] . *Biochimica et Biophysica Acta*, **1608**: 181—189

Ajayi W, Chaudhuri M, Hill GC, 2002 . Site-directed mutagenesis reveals the essentiality of the conserved residues in the putative diiron active site of the trypanosome alternative oxidase [J] . *J Biol Chem*, **277**: 8187—8193

Albury MS, Affourtit C, Moore AL, 1998 . A highly conserved glutamate residue (Glu-270) is essential for alternative oxidase activity [J] . *J Biol Chem*, **273** : 30301—30305

Albury MS, Affourtit C, Crichton PG *et al* . 2002 . Structure of the plant alternative oxidase: site-directed mutagenesis provides new information on the active site and membrane topology [J] . *J Biol Chem*, **277**: 1190—1194

Amor Y, Chevion M, Levine A, 2000 . Anoxia pretreatment protects soybean cells against H202-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase [J] . *FEES Lett*, **477**: 175—180

Andersson ME, Nordlund P, 1999 . A revised model of the active site of alternative oxidase [J] . *FEBS Lett*, **449**: 17—22

Arnholdt-Schmitt B, Costa JH, de Melo DF, 2006 . AOX-a functional marker for efficient cell reprogramming under stress [J] . *Trends in Plant Science*, **11** (6): 281—287

Bahr JT, Bonner WD, 1973 . Cyanide-insensitive respiration [J] . *J Biol Chem*, 248

Berthold D, Andersson ME, Nordlund P, 2000 . New insight into the structure and function of the alternative oxidase [J] . *Biochim Biophys Acta*, **1460**: 241—254

Berthold DA, Voevodskaya N, Stenmark P *et al* . 2002 . EPR studies of the mitochondrial alternative oxidase-evidence for a diiron carboxylate center [J] . *J Biol Chem*, **277**: 43608—43614

Berthold DA, Stenmark P, 2003 . Membrane-bound diiron carboxylate proteins [J] . *Annu Rev Plant Biol*, **54**: 497—517

Borecky J, Vercesi AE, 2005 . Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: Energy metabolism and stress [J] . *Bioscience Reports*, (3-4): 271—286

Chaudhuri M, Ajayi W, Hill GC, 1998 . Biochemical and molecular properties of the Trypanosoma brucei alternative oxidase [J] . *Mol Biochem Parasitol*, **95**: 53—68

Clifton R, Millar AH, Whelan J, 2006 . Alternative oxidases in Arabidopsis: A comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses [J] . *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergettcs*, **1757** (7): 730—741

Considine MJ, Holtzapffel RC, Day DA *et al* . 2002 . Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots [J] . *Plant Physiol*, **129**: 949—953

Cottingham IR, Moore AL, 1983 . Biquinone pool behaviour in plant mitochondria [J] . *Biochimica et Biophysica Acta*, **724**: 191—200

Dai QL (代其林), Guo YM (郭云梅), He L (何礼) *et al* . 2004 . A Comparative Study on Induction of the ON resistant Respiration and the Expression of Alternative Oxidasein Different Organs of Bean Seedling Treated by Salicylic Acid [J] . *J Sichuan Univ* (Nat Sci Ed) **四川大学学报 (自然科学)**, **42** (1): 174—178

Djajanegara L, Holtzapffel R, Finnegan PM *et al* . 1999 . A single amino acid change in the plant alternative oxidase alters the specificity of organic acid activation [J] . *FEBS Lett*, **454**: 220—224

Elthon TE, Nickels RL, McIntosh L, 1989 . Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondrial [J] . *Plant Physiol*, **89**: 1311—1317

Finnegan PM, Whelan J, Millar AH *et al* . 1997 . Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase [J] . *Plant Physiol*, **114**: 455—466

Fiorani F, Umbach AL, Siedow JN, 2005 . The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature . A study of Arabidopsis AOX1a transgenic plants [J] . *Plant Physiology*, **139** (4): 1795—1805

Fukai Y, Kawai K, 2003 . Purification of active recombinant trypanosome alternative oxidase [J] . *FEBS Letters*, **538**: 35—40

Hansen LD, Church JN, Matheson S *et al* . 2002 . Kinetics of plant growth and metabolism [J] . *Thermochim Acta*, **388**: 415—425

He QX (何军贤), Wei ZQ (韦振泉), Lian HG (梁厚果) *et al* . 1999 . Effects of Water Stress on the Cyanide2resistant Respiration and Expression of the Alternative Oxidase Gene in Wheat Seedlings [J] . *Sci Chin* (Series C) (**中国科学 C辑**), **29** (4): 407—412

Hoefnagel MHN, Wiskich JT, Madgwick SA *et al* . 1995a . New inhibitors of the ubiquinol oxidase of higher plant mitochondrial [J] . *Eur J Biochem*, **233**: 531—537

Hoefnagel MHN, Millar AH, Wiskich JT *et al* . 1995b . Cytochrome and alternative respiratory pathways compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondrial [J] . *Arch Biochem Biophys*, **318** : 394—400

Hoefnagel MHN, Rich PR, Zhang QS *et al* . 1997 . Substrate kinetics of the plant mitochondrial alternative oxidase and the effects of pyruvate [J] . *Plant Physiol*, **115**: 1145—1153

Holtzapffel RC, Finnegan PM, Millar AH *et al*, 2002 . Mitochondrial protein expression in tomato fruit during on-vine ripening and cold storage [J] . *Funct Plant Biol*, **29**: 827—834

Holtzapffel RC, Castelli J, Finnegan PM *et al* . 2003 . A tomato alternative oxidase protein with altered regulatory properties [J] . *Biochim Biophys Acta*, **1606**: 153—162

Hourton-Cabassa U, Matos AR, Zachowski A *et al* . 2004 . The plant uncoupling protein homologues: a new family of energy-dissipating proteins in plant mitochondrial [J] . *Plant Physiol Biochem*, **42**: 283—290

Karpova OV, Kuzmin EV, Elthon TE *et al* . 2002 . Differential expression of alternative oxidase genes in maize mitochondrial mutants [J] . *Plant Cell*, **14**: 3271—3284

Kumar AM, Soll D, 1996 . Arabidopsis alternative oxidase sustains *E. coli* respiration [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, **89**: 10842—10846

Lambers H, 1982. Cyanide-resistant respiration: A non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow [J]. *Physiology Plant*, **55**: 478—485

Leach GR, Krab K, Whitehouse DG *et al*. 1996. Kinetic analysis of the mitochondrial quinol-oxidizing enzymes during development of thermogenesis in *Arum maculatum* [J]. *Biochem J*, **317**: 313—319

Lei XY (**雷晓勇**), Huang L (**黄蕾**), Tian MS (**田梅生**) *et al*. 2002. Isolation and Identif ication of AOX (Alternative Oxidase) in ‘Royal Gala’ Apple Fruits [J]. *Chin Bull Bot* (**植物学通报**), **19** (9): 739—742

Liang WS (**梁五生**), Liang HG (**梁厚果**), 1997. Progress of the Study on Alternative Oxidase [J]. *Chin Bull Bot* (**植物学通报**), **14** (2): 9—16

Liang WS (**梁五生**), Liang HG (**梁厚果**), 1999. Induction of Alternative Oxidase Expression by Endogenous Ethylene in Aging Potato Tuber Slices [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (**植物生理学报**), **25** (2): 205—208

Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L, 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 8271—8276

Maxwell DP, Nickels R, McIntosh L, 2002. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence [J]. *Plant J*, **29**: 269—279

Meeuse BJD, 1975. Thermogenic respiration in aroids [J]. *Ann Rev Plant Physiol*, **26**: 117—126

Millar AH, Wiskich JT, Whelan J, 1993. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondrial [J]. *FEBS Lett*, **329**: 259—262

Millar AH, Bergersen FJ, Day DA, 1994. Oxygen-affinity of terminal oxidases in soybean mitochondrial [J]. *Plant Physiol Biochem*, **32**: 847—85270

Millar AH, Atkin OK, Lambers H *et al*. 1995. A critique of the use of inhibitors to estimate partitioning of electrons between mitochondrial respiratory pathways in plants [J]. *Physiol Plant*, **95**: 523—532

Millar AH, Hoefnagel MHN, Day DA *et al*. 1996. Specificity of the organic acid activation of alternative oxidase in plant mitochondrial [J]. *Plant Physiol*, **111**: 613—618

Moore AL, Bonner WD, Rich PR, 1978. Determination of protonmotive force during cyanide-insensitive respiration in plant mitochondrial [J]. *Arch Biochem Biophys*, **186**: 298—306

Moore AL, Dry LB, Wiskich JT, 1988. Measurement of the redox state of the ubiquinone pool in plant mitochondrial [J]. *FEBS Lett*, **235**: 76—80

Purvis AC, Shewfelt RL, 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues [J]. *Physiol Plant*, **88**: 712—718

Rhoads DM, McIntosh L, 1991. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott) [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, **88**: 2122—2126

Rhoads DM, Umbach AL, Sweet CR *et al*. 1998. Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase from plant mitochondrial-identification of the cysteine residue involved in a-keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation [J]. *J Biol Chem*, **273**: 30750—30756

Ribas-Carbo M, Berry JA, Azcon-Bieto J *et al*. 1994. The reaction of the plant mitochondrial cyanide-resistant alternative oxidase with oxygen [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1188**: 205—212

Ribas-Carbo M, Wiskich JT, Berry JA *et al*. 1995. Ubiquinone redox behavior in plant mitochondrial during electron transport [J]. *Arch Biochem Biophys*, **317**: 156—160

Rosenzweig AC, Frederick CA, Lippard SJ *et al*. 1993. Crystal structure of a bacterial non-heme iron hydroxylase that catalyzes the biological oxidation of methane [J]. *Nature*, **366**: 537—543

Saika H, Ohtsu K, Hamanaka S *et al*. 2002. AOXIc, a novel rice gene for alternative oxidase: comparison with rice AOXla and AOX1b [J]. *Genes Genet Syst*, **77**: 31—38

Siedow JN, Whelan J, Kearns A *et al*. 1992. Topology of the alternative oxidase in soybean mitochondrial [A]. In: Lambers H, Van der Plas LHW, eds, Molecular, biochemical and biophysical aspects of plant respiration [M]. SPB Academic Publi, 19—27

Siedow JN, Umbach AL, 1995. Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology [J]. *Plant Cell*, **7**: 821—831

Umbach AL, Siedow JN, 1993. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondrial and their relationship to enzyme activity [J]. *Plant Physiol*, **103**: 845—854

Umbach, AL, Wiskich JT, Siedow JN, 1994. Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondrial [J]. *FEBS Lett*, **348**: 181—184

Umbach AL, Siedow JN, 1996. The reaction of the soybean cotyledon mitochondrial cyanide-resistant oxidase with sulfhydryl-reagents suggests that (x-keto acid activation involves the formation of a thiohemiacetal [J]. *J Biol Chem*, **271**: 25019—25026

Umbach AL, Gonzalez-Meler MA, Sweet CA *et al*. 2002. Activation of the plant mitochondrial alternative oxidase: insights from site-directed mutagenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1554**: 118—128

Umbach AL, Fiorani F, Siedow JN, 2005. Characterization of transformed Arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue [J]. *Plant Physiol*, (4): 1806—1820 DEC 2005

Vanlerberghe GC, Day DA, Wiskich JT *et al*, 1995. Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondrial-dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation [J]. *Plant Physiol*, **109**: 353—361

Vanlerberghe GC, McIntosh L, Yip YH, 1998. Molecular localization of a redox-modulated process regulating plant mitochondrial electron transport [J]. *Plant Cell*, **10**: 1551—1560

Vanlerberghe GC, Robson CA, Yip JYH, 2002 . Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death [J] . *Plant Physiol*, **129**: 1829—1842

Wagner AM, Moore AL, 1997 . Structure and Function of the Plant Alternative Oxidase: Its Putative Role in the Oxygen Defence Mechanism [J] . *Biosci Rep*, **17**: 319—322

Wendt KU, Lenhart A, Schulz GE, 1999 . The structure of the membrane protein squalene-hopene cyclase at 2.0 angstr6m resolution [J] . *J Mol Biol*, **286**: 175—187

Whitewood DG, Moore AL, 2004 . Respiratory Chain and ATP Synthase [J] . *Encyclopedia of Biol Chem*, **3**: 671—676

Wu DY, Wright DA, Wetzel C *et al* . 1999 . The IMMUTANS variegation locus of Arabidopsis defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis [J] . *Plant Cell*, **11**: 43—55

Wu Q (吴强), Li HY (李红玉), Zhang LX (张立新) *et al* . 2003 . The Stress and the cyanide-resistant respiration [J] . *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **23** (1): 164—170

Yan YC (晏婴才), Lin HH (林宏辉), Liang HG (梁厚果) *et al* . 2002 . A comparative study on detection of the expression of alternative oxidase in Tobacco callus with the monoclonal antibody against alternative oxidase and antibody against-synthetic polypeptide antibody [J] . *Acta Bot Sin* (植物学报), **44** (10): 1255—1257

Yan YC (晏婴才), Lin HH (林宏辉), Liang HG (梁厚果) *et al* . 2004 . Comparison of the effects of different low temperature stresses on the induction of the cyanide-resistant alternative pathway and the expression of alternative oxidase in Tobacco callus [J] . *Chin Bull Bot* (植物学通报), **21** (3): 296—305

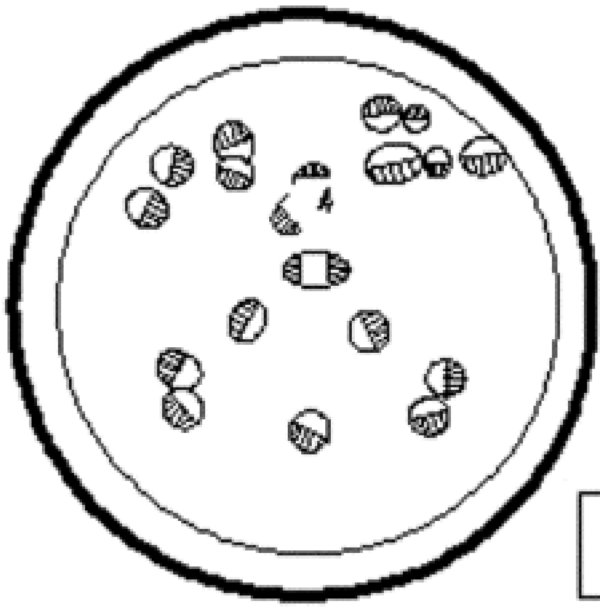
Zhang QS, Hoefnagel MHN, Wiskich JT, 1996 . Alternative oxidase from *Arum* and soybean: its stabilization during purification [J] . *Physiol Plant*, **96** : 551—558

Zhou GK (周功克), Kong YZ (孔英珍), Li HY (李红玉) *et al* . 2000 . Relationship between active oxygen spices and the cyanide resistant respiration in Tobacco callus under heat stress [J] . *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **26** (3): 241—246

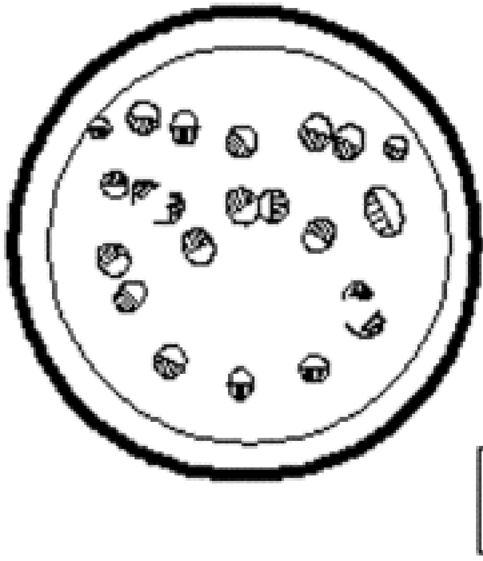
* * * * * * * * * * * * * * *

补 充 说 明

发表于本刊2007年第2期176～188码的伍映辉等作者文章：“八种苏铁植物叶轴的比较解剖研究”。由于印刷的原因，图版Ⅴ中的39、40两图，没有将维管束排列方式完整显示出，现重新排版该两图，以便读者对该图有一个完整的了解。



39



40